

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月1日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770038

研究課題名（和文）植物の茎頂分裂組織に遠隔的に作用するシグナルの制御に関わる分子機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of long-distance signals for regulation of the shoot apical meristem of plants

研究代表者

打田 直行（UCHIDA NAOYUKI）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：40467692

研究成果の概要（和文）：植物の地上部器官は茎頂分裂組織(SAM)から生まれる。このSAMに対してSAM外部から遠隔的に影響を与える作用が示唆されつつあるが、そこに関わる分子機構はほぼ解明されていない。本研究では、その仕組みを解明する手がかりとして、そこに関わる可能性が考えられたERECTA受容体と、それに作用するペプチド因子に関して解析を行った結果、これまでに全く報告のなかった新しい細胞間コミュニケーションの発見を達成することが出来た。

研究成果の概要（英文）：The shoot apical meristem (SAM) creates all above-ground tissues of plant body. It is implied that the SAM is regulated by signals that is originated in tissues outside the SAM. However, little is known about such a non-cell-autonomous signals. In this research, I focused on a receptor-kinase called ERECTA, which has been implicated in regulation of the SAM but its ligand for the SAM regulation is unclear. I succeeded in the identification of new ligands for ERECTA and showed that the novel cell-cell communication via the ligand-receptor pair plays a significant role for the regulation of plant architecture.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：ERECTA, 受容体, リガンド, 細胞間コミュニケーション

1. 研究開始当初の背景

植物個体は芽生えた場所で移動せずに育つため、内外の環境の変化に対して柔軟に適應する仕組みを持っている。今までに植物の発

生に関わる様々なメカニズムが明らかとなってきたが、近年、変化する内外の環境に應答してそれらの発生メカニズムがどのように対応するのか、という点に非常に高い関心

が寄せられつつある。その高等植物は多様な細胞群の集合により構成される多細胞生物であるため、1個体としての調和を保ち、かつ、内外の変化に対して個体としての応答を行って生育するには、その体を構成する種々の細胞間での様々な情報のやりとりが必須となる。しかし、それら細胞間のコミュニケーションの植物の形作りにおける役割に関して、これまでに解明された例は極めて限られている。研究開始時点までに、SAM 内部に存在する幹細胞を維持するために SAM 内部で自律的に機能することが過去に明らかとされてきた仕組み(WUSCHEL-CLAVATA3 システムなど)については数多くの報告があった。それに対して、この SAM に対して SAM 外部から遠隔的に影響を与える作用が示唆されつつあるが、そのようなメカニズムに関しての報告は極めて限定的であった。

2. 研究の目的

本研究においては、SAM の外部で活性化したシグナルが遠隔的に作用するメカニズムの解明を目指す。その手がかりとして、研究代表者のそれまでの解析から SAM の制御に関わる可能性が考えられた受容体である ERECTA 受容体に着目した。この受容体の働く仕組みの解明を通じて、新しい細胞間コミュニケーションによる植物の発生制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

1) *ERECTA* 遺伝子の発現場所に関しては、過去の報告において広汎な組織で発現することは知られていたが、おおまかな解析のみが遂行されていて、詳細な発現解析は為されていなかった。そこでまず、研究代表者自らの手でその発現解析をやり直し、詳細な発現パターンを解析した。

2) 上記の発現パターンの解析の結果、*ERECTA* 遺伝子の発現は複数の組織で観察された。一方で、*ERECTA* 遺伝子の機能が欠損した変異体 (*erecta* 変異体) は野生型とは花序の形態が異なる特徴を持つ。そこで、*ERECTA* 遺伝子の発現が確認された各発現組織においてそれぞれの組織に特異的に活性を持つプロモーターを用いて *ERECTA* を発現させた時に、どの組織での *ERECTA* の発現が *erecta* 変異体の異常を回復させることが出来るの

かを解析し、*ERECTA* が受容体として機能を発揮する上で重要な制御ポイントとなる組織を同定した。

3) *ERECTA* が受容体であることから、花序形態制御の際に *ERECTA* に作用するリガンドの存在が予想されたので、次にその同定を試みた。*ERECTA* にはファミリータンパク質群 (*ERECTA* ファミリー) が存在し、この *ERECTA* ファミリーが機能冗長的に気孔の発生で働くことと、さらにその気孔制御の際に *ERECTA* ファミリーに作用するリガンドも報告されている。一方でシロイヌナズナのゲノムには、そのリガンドと配列が類似するが機能が不明な遺伝子があと 8 つ存在したので、これらを花序形態制御での *ERECTA* リガンド候補として解析した。特に、各リガンド候補の機能が欠損した変異体の表現型解析に重点をおき、*erecta* 変異体と同様の花序異常を表すものを探索した。

4) 上記の結果、*ERECTA* の花序形態制御におけるリガンドの同定に成功したので、次にその発現パターンの解析を行った。その際には、GUS レポーターを用いた。

5) 上記の結果、リガンドの発現が認められた箇所でのみ活性を持つプロモーターを用いてそのリガンドを発現させ、リガンドの機能欠損体の異常を回復させることが出来るかの検討を行った。

6) *ERECTA* と今回同定したリガンドが実際に物理的に相互作用するのかを、タバコの葉に両因子を過剰発現させる系での免疫沈降実験により解析した。

4. 研究成果

1) 茎における *ERECTA* 遺伝子の発現場所をプロモーターGUS レポーター植物を作成して詳細に調べたところ、すでに *ERECTA* の関与が報告されている気孔の制御のために表皮で発現しているのに加えて、新たに篩部とも区部でも *ERECTA* 遺伝子が発現していることが明らかとなった。

2) *ERECTA* 遺伝子の発現が認められた表皮、篩部、木部のうちのどの組織での発現が *erecta* 変異体の花序の形態制御に関わるのかを調べたところ、*ERECTA* 遺伝子が篩部伴細胞で働くことが花序の形態制御にとって重

要であることが明らかとなった。

3) 受容体である ERECTA のリガンド候補因子群の変異体の表現型を解析していく過程で、*EPFL4* と *EPFL6* と呼ばれるリガンド候補をコードする二つの遺伝子の機能が共に欠損した *epfl4 epfl6* 二重変異体が *erecta* 変異体とほぼ同様の花序の表現型を持つことが明らかとなり、*EPFL4* と *EPFL6* が花序の形態制御に置ける ERECTA のリガンドであることが強く示唆された。

4) *EPFL4* 遺伝子と *EPFL6* 遺伝子の発現場所をプロモーター-GUS レポーター植物を作成して詳細に調べたところ、茎の内皮細胞層に特異的に強い発現が観察された。このことをさらに確認するために、内皮細胞層を形成できない変異体である *shr* 変異体での *EPFL4* 遺伝子と *EPFL6* 遺伝子の発現を調べたところ、茎での発現の著しい減少が見られた。すなわち *EPFL4* 遺伝子と *EPFL6* 遺伝子は内皮細胞で働いている可能性が非常に強く示唆された。

5) *epfl4 epfl6* 二重変異体で見られた花序の形態異常に関して、内皮細胞層における *EPFL4* 遺伝子と *EPFL6* 遺伝子の発現の欠損が重要な要因であったことを確認するために、内皮細胞層特異的に活性を持つプロモーターである *SCR* プロモーターで *EPFL4* と *EPFL6* をそれぞれ発現させたところ、どちらの場合においても *epfl4 epfl6* 二重変異体で見られた花序の形態異常が完全に回復した。すなわち、内皮細胞層における *EPFL4* 遺伝子と *EPFL6* 遺伝子の発現が花序の形態制御にとって非常に重要な要因となることが明らかとなった。

6) これまでの遺伝学的な解析から、*EPFL4* と *EPFL6* というリガンドが受容体である ERECTA に作用するという仕組みが、花序の形態制御において非常に重要である可能性が強く提示されたので、生化学的にその裏付けを行うために、*EPFL4* と *EPFL6* がそれぞれ ERECTA と物理的に相互作用するのかどうかの検定を行った。それぞれの因子に別個のタグを付与してタバコの葉に両因子を共過剰発現させた後に免疫沈降実験を行ったところ、*EPFL4* と *EPFL6* ともに ERECTA と共沈降することが明らかとなった。すなわち、リガンド候補である *EPFL4* と *EPFL6* は遺伝学的にも生化学的にも受容体である ERECTA の実際のリガンドであることが明らかとなった。

以上の研究の結果、内皮細胞から分泌されるシグナル分子が篩部伴細胞で発現する受容体により受容されるという全く新しいコミュニケーションが花序の形作りで重要な役割を果たすことが明らかとなった。一方で、今回明らかとなった制御の上流や下流で働く仕組みに関してはほとんど不明なままである。現在はその未解明な部分についての追求を行うステップに向けた準備を行っているところであり、今後のさらなる解析により、全体像が明らかとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

① Uchida N, Lee JS, Horst RJ, Lai HH, Kajita R, Kakimoto T, Tasaka M, Torii KU. Regulation of inflorescence architecture by intertissue layer ligand-receptor communication between endodermis and phloem. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2012, 査読有, in press

② Uchida N, Igari K, Bogenschutz NL, Torii KU, Tasaka M. Arabidopsis ERECTA-family Receptor Kinases Mediate Morphological Alterations Stimulated by Activation of NB-LRR-type UNI proteins. Plant Cell Physiol., 52, 804-814, 2011, 査読有

③ Uchida N, Sakamoto T, Kurata T, Tasaka M. Identification of EMS-induced Causal Mutations in a Non-Reference Arabidopsis thaliana Accession by Whole Genome Sequencing. Plant Cell Physiol., 52, 716-722, 2011, 査読有

④ Uchida N and Tasaka M. Regulation of NB-LRR-type UNI and its related signaling pathway. Plant Signal. Behav., 6, 1219-1222, 2011, 査読有

⑤ Uchida N and Tasaka M. Intersections between immune responses and morphological regulation in plants. J. Exp. Bot., 61, 2539-2547, 2010, 査読有

〔学会発表〕(計4件)

① 打田直行, Lee JS, Horst RJ, Lai HH, 梶田良子, 柿本辰男, 田坂昌生, 鳥居啓子, Endodermis-Phloem Communication for Inflorescence Architecture., 日本植物生理学会年会第53回大会, 2012.3.18, 京都

② 打田直行, Endodermis-Phloem Communication for Inflorescence Architecture., NAIST国際シンポジウム「Top Runners ～Women's life in Science～」, 2012.1.19, 奈良

③ 打田直行, Message from endodermis to phloem ～Novel cell-cell communication for inflorescence architecture～, 特定領域研究「植物メリステムと器官の発生を支える情報統御系」若手ワークショップ, 2011.10.14, 滋賀

④ 打田直行, シロイヌナズナにEMSで導入した原因SNPのゲノムシーケンスによる迅速な同定法, NAIST植物グローバル教育プロジェクトワークショップ「高速シーケンスによる新たな研究アプローチ」, 2011.6.8, 奈良

6. 研究組織

(1) 研究代表者

打田 直行 (UCHIDA NAOYUKI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：40467692

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし